

## MINIREVIEW

## ANALISIS MOLEKULAR GEN YANG MENGENDALIKAN RESISTENSI BAKTERI TERHADAP TEMBAGA

Wahyu Irawati\*

## PENDAHULUAN

Resistensi bakteri terhadap tembaga secara molekuler banyak dipelajari pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* yang menginfeksi tanaman tomat di California dan di Mexico. Isolasi plasmid dari 20 strain bakteri ini menunjukkan adanya 5 jenis plasmid berdasarkan ukuran, yaitu A (95 – 102 kb), B (71 – 83 kb), C (59 – 67 kb), D (37 – 39 kb), dan E (29 kb). Bakteri yang paling resisten adalah strain PT23. Resistensi bakteri ini dikendalikan oleh plasmid yang berukuran 35 kb (jenis D). Plasmid 35 kb hanya ada pada strain bakteri yang resisten terhadap tembaga dan tidak diketemukan pada strain bakteri yang sensitif (Bender dan Cooksey, 1987). Plasmid 35 kb pada strain PT23 dinamakan

pPT23D, dan dijadikan bahan penelitian lebih lanjut (Bender dan Cooksey, 1986).

Pemotongan plasmid pPT23D dengan berbagai enzim endonuklease restriksi menunjukkan bahwa fragmen 4,5 kb hasil pemotongan dengan enzim *Pst*I mengandung gen-gen penentu resistensi Cu (Bender dan Cooksey, 1987).

Menurut Mellano dan Cooksey (1988a), gen disusun dalam satu operon, disebut operon Cop, yang dikendalikan oleh satu promotor. Operon cop terdiri atas empat gen struktural, yaitu copA (1,827bp), copB (984 bp), copC (378 bp), dan copD (930 bp). Ekspresi gen copABCD dikendalikan oleh dua gen regulator, yaitu copR dan cops (Mills *et al.*, 1993).

Gen copABCD secara keseluruhan berperan mengendalikan resistensi bakteri terhadap Cu. Ekspresi gen copABCD hanya diinduksi oleh tembaga ( $\text{CuSO}_4$ ), dan tidak diinduksi oleh logam lain seperti merkuri, seng, kadmium, dan timah. Hal ini menunjukkan bahwa induksi gen cop bersifat spesifik (Mellano dan Cooksey, 1988b).

Analisa delesi dan mutasi menunjukkan bahwa copA dan copB memegang peranan penting dalam mengendalikan resistensi, sedangkan copC dan copD hanya berperan sebagai pelengkap. Resistensi tidak terjadi bila copA dan copB dihilangkan, namun bakteri masih dapat resisten terhadap Cu pada konsentrasi rendah bila copC dan copD yang dihilangkan (Mellano dan Cooksey, 1988a).

Operon cop secara keseluruhan mengandung G+C sebanyak 60% dan kaya akan metionin. Sekuen nukleotida copA dan copB menunjukkan bahwa daerah copB mengandung 24 basa yang diulang sebanyak lima kali. Daerah pengulangan terdiri dari 8 asam amino yang

sangat dikonservasi dengan struktur umum asp-his-ser-gln/lis-met-gln-gli-met. Daerah copA kurang dikonservasi dan diulang-ulang seperti pada copB. Struktur umum copA adalah asp-his-X-X-met-X-X-met (Mellano dan Cooksey, 1988a), dan mengandung 18 residu histidin (Cha dan Cooksey, 1991). Protein copC tidak mengandung sistein tetapi mengandung beberapa residu asam aspartat, histidin, dan metionin. Ada satu daerah pada protein copC yang mirip dengan sekuen pengulangan pada copA dan copB (Cooksey, 1994).

Sekuen asam amino copA mirip dengan protein pengikat tembaga biru plastocyanin (18 asam amino) dan azurin (10 asam amino). Protein tembaga biru plastocyanin dan azurin mengikat tembaga di antara atom sulfur dari sistein dan metionin, dan di antara atom nitrogen gugus imidazol dua residu histidin. Daerah pengulangan copA tidak mengandung sistein namun kaya akan metionin dan histidin yang dapat berperan sebagai daerah pengikatan Cu (Mellano dan Cooksey, 1988a).

\* Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Antar Universitas, Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

## HOMOLOGI GEN RESISTEN TEMBAGA ANTAR BAKTERI RESISTEN TEMBAGA

Sistem resistensi Cu yang dikendalikan oleh operon cop pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* juga terdapat pada bakteri resisten tembaga lainnya, yaitu *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* dan *Xanthomonas campestris*. Ada homologi antara operon cop pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* dengan gen-gen resisten tembaga pada bakteri tersebut.

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas putida*, dan *Pseudomonas fluorescens* resisten Cu yang diisolasi dari tanaman dan biji tomat, menunjukkan adanya homologi DNA dengan operon cop *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Homologi DNA antara *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, dan *Pseudomonas putida* dengan operon cop terjadi pada plasmid dan kromosom, sedangkan homologi antara *Pseudomonas cichorii* dan *Pseudomonas fluorescens* dengan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hanya terjadi pada kromosom (Cooksey et al., 1996).

Homologi DNA dengan operon cop juga ditemukan pada kromosom 9 strain *Pseudomonas* sp. resisten Cu yang diisolasi dari

daerah terkontaminasi logam berat. Strain-strain tersebut memiliki plasmid, namun resistensi Cu dikendalikan oleh kromosom. Gen *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO menunjukkan adanya homologi dengan gen cop *Pseudomonas syringae* (Vargas et al., 1995).

Gen resisten Cu pada *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* terletak pada kromosom. Sekuen nukleotida gen tersebut mirip dengan gen resisten Cu pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Gen resisten Cu pada *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* juga memiliki urutan nukleotida yang mirip dengan gen resisten Cu pada *Pseudomonas syringae* dan *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Lee et al., 1994).

Gen yang mengendalikan resistensi *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* terhadap Cu terdiri dari empat Open Reading Frame (ORF), yaitu ORF1, ORF2, ORF3, dan ORF4. Homologi urutan asam amino ORF1, ORF2, ORF3, dan ORF4 dengan copA, copB, copC, dan copD berturut turut adalah 65%, 45%, 47%, dan 40%. Tidak ada homology antara ORF5 dengan copR pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. CopR adalah protein regulator yang terlibat dalam

penginduksian promotor cop. Tidak diketahui apakah ORF5 mempunyai fungsi regulator dan berhubungan dengan ekspresi gen-gen yang mengendalikan resistensi terhadap Cu (Lee et al., 1994).

Daerah yang paling dikonservasi diantara dua perangkat gen tersebut adalah ORF1 dengan copA dan daerah C-terminal ORF2 dengan copB, sedangkan ORF3 dan ORF4 kurang dikonservasi. CopA mengandung empat daerah pengulangan dari oktapeptida yang sangat dikonservasi dengan sekuen asp-his-x-x-met-x-x-met, sedangkan ORF1 hanya mengandung satu oktapeptida tersebut tanpa adanya pengulangan (Lee et al., 1994).

Pengulangan langsung oktapeptida yang sangat dikonservasi ditemukan pada copA dan copB. Pengulangan ini merupakan daerah pengikatan Cu yang bertanggung jawab untuk mengeluarkan Cu dari sitoplasma. Pola pengulangan ini tidak terdapat pada ORF1 dan ORF2, sehingga diduga fungsi ORF1 dan ORF2 berbeda dengan copA dan copB (Lee et al., 1994).

Susunan gen yang mengendalikan resistensi *Escherichia coli* terhadap Cu homolog dengan

operon cop. Sistem resistensi pada *Escherichia coli* dikendalikan oleh plasmid pRJ1004. Gen yang mengendalikan resistensi Cu tersusun atas enam gen struktural yaitu pCoA, pCoB, pCoC, pCoD, pCoR, dan pCoS. Gen pCo ABCDRS homolog pada tingkat asam amino dengan copABCDRS (Brown et al., 1995). Kesamaan urutan asam amino antara pCoABCDR dan copABCDR berturut-turut adalah 76%, 54%, 60%, 38%, dan 61% (Lee et al., 1994).

Perbandingan antara sistem resistensi pada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (cop) dengan *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (ORF), dan *Escherichia coli* (pCo) menunjukkan bahwa ORF yang pertama yaitu copA, ORF1, dan pCoA lebih homolog dibanding ORF lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa ORF yang pertama mengandung daerah struktural dan fungsional yang paling penting untuk aktivitas resistensi terhadap Cu (Lee et al., 1994).

Walaupun ada kemiripan struktur antara operon cop dengan gen resisten Cu pada bakteri lain, ada perbedaan dalam tingkat urutan gen, fungsi, dan ekspresi gen ketika diinduksi Cu

(Cooksey, 1996). Gen resisten Cu pada *Xanthomonas campestris* tidak dapat diekspresikan ketika diklon pada *Pseudomonas syringae* maupun *Escherichia coli*. Promotor cop tidak dapat berperan ketika diklon pada *Xanthomonas sp.* maupun *Escherichia coli*. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun ada kemiripan antara gen resisten Cu, ada perbedaan secara fungsional dalam tingkat pengendalian ekspresi gen (Voloudakis *et al.*, 1993 ; Mills *et al.*, 1993).

Gen Cop tidak dapat berfungsi ketika diklon pada *Xanthomonas campestris* dan *Escherichia coli*, sebaliknya gen resisten Cu pada *Xanthomonas campestris* tidak dapat berfungsi pada *Pseudomonas syringae* maupun *Escherichia coli*. Ekspresi gen cop dan pCo hanya beradaptasi pada masing-masing taksa bakteri secara spesifik. Hal ini menunjukkan bahwa pengendalian operon resisten Cu bersifat spesifik terhadap inang asli (Ji dan Silver, 1995).

## MEKANISME RESISTENSI BAKTERI TERHADAP TEMBAGA

Secara umum ada dua jenis mekanisme resistensi bakteri

terhadap tembaga, yaitu melalui sistem operon cop seperti pada *Pseudomonas sp.* dan sistem pCo seperti pada *Escherichia coli*. Produk gen operon cop merupakan protein pengikat Cu yang berperan mengakumulasi Cu untuk mencegah masuknya ion Cu pada tingkat toksik ke dalam sitoplasma. *Escherichia coli* mengekspresikan gen gen pCo bukan untuk mengakumulasi Cu melainkan untuk mentranspor Cu keluar dari sitoplasma (Voloudakis *et al.*, 1993).

### 1. Mekanisme resistensi dengan cara mengakumulasi Cu di dalam sel

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mengakumulasi tembaga pada periplasma dan membran luar serta membentuk koloni biru pada media yang mengandung tembaga. Mekanisme resistensi ini dikendalikan oleh gen pada operon cop. Produk gen operon cop adalah protein copA, copB, copC, dan copD. Urutan asam amino copA, copB, copC, dan copD banyak mengandung histidin dan metionin (Cooksey dan Azad, 1992). Protein protein ini secara bersama-sama berperan dalam

pengikatan dan akumulasi tembaga pada periplasma dan membran luar (Cha dan Cooksey, 1991).

Protein copA (72 kDa), copB (39 kDa), dan copC (12 kDa) hanya disintesis di bawah penginduksian tembaga. Protein copA dan copC adalah protein pengikat tembaga biru yang berada di periplasma. Setiap molekul copA mengikat 11 atom Cu, sedangkan molekul copC mengikat 1 atom Cu. Protein copB adalah protein transmembran yang berada di membran luar, berperan sebagai pengikat Cu, dan terlibat dalam proses akumulasi. Kapasitas pengikatan copB belum diketahui (Cha dan Cooksey, 1991). Protein copD diduga merupakan protein membran dalam yang bersama-sama dengan copB berperan dalam proses pengambilan Cu (Cha dan Cooksey, 1993).

Operon cop mengkode protein periplasma (copA, copC), protein membran luar (copB), dan protein membran dalam (copD) ketika diinduksi tembaga. Tembaga diikat oleh protein copB dan ditranspor ke dalam periplasma. Di dalam periplasma, Cu diikat oleh protein copA (Ji dan Silver, 1995). Protein copA dan

copB disintesis melimpah dalam kondisi penginduksian sehingga koloni bakteri berwarna biru dengan terakumulasinya tembaga pada membran luar dan periplasma (Cooksey, 1994). Protein copA, copB, dan copC mengikat Cu pada periplasma dan membran luar sehingga mencegah masuknya Cu pada konsentrasi toksik ke dalam sitoplasma (Cooksey dan Azad, 1992). Keberhasilan mekanisme resistensi ditentukan oleh kapasitas pengikatan Cu dari protein membran luar dan periplasma ini untuk mencegah masuknya ion Cu yang berlebihan ke dalam sitoplasma (Mellano dan Cooksey, 1988a). Protein copC dan copD juga terlibat dalam transpor Cu dari ruang periplasma ke dalam sitoplasma untuk mentransfer Cu pada enzim yang membutuhkan (Ji dan Silver, 1995).

### 2. Mekanisme resistensi dengan cara mentranspor Cu keluar sel

Mekanisme resistensi pada *Escherichia coli* mengakibatkan penurunan akumulasi dengan cara memompa Cu keluar sitoplasma, namun mekanismenya

belum diketahui dengan baik (Silver dan Ji, 1994). Sel yang diinduksi tembaga, mengakumulasi Cu lebih sedikit dibanding sel yang tidak diinduksi. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme resistensi dilakukan dengan cara mentranspor Cu keluar sel (Rouch *et al.*, 1985). Akumulasi Cu selama pertumbuhan fase log menurun, setelah itu meningkat pada fase stasioner (Brown *et al.*, 1995).

Sistem resistensi pada *Escherichia coli* dikendalikan oleh gen gen pCo pada plasmid. Ada empat produk gen pCo, yaitu protein membran dalam (pCoD), protein membran luar (pCoB), dan protein pengikat Cu pada periplasma (pCoA dan pCoB). Sintesis gen gen tersebut dikendalikan oleh dua protein regulator, yaitu pCoR dan pCoS (Silver dan Ji, 1994).

Beberapa gen pada kromosom juga terlibat dalam homeostatis tembaga sebagaimana gen gen pCo pada plasmid (Silver dan Wadelhaugh, 1992). Gen gen pada kromosom ini selain dibutuhkan untuk resistensi terhadap Cu juga berperan dalam transpor Cu dalam keadaan normal (Cha dan Cooksey, 1993).

Sistem resistensi pada kromosom terdiri dari enam gen, yaitu cutA, cutB, cutC, cutD, cutE, dan cutF. Mutasi salah satu gen ini menyebabkan bakteri menjadi sensitif terhadap tembaga. Gen gen tersebut berperan dalam pengambilan, penyimpanan intraseluler, pengiriman, dan pengeluaran Cu pada *Escherichia coli*. Peranan gen-gen tersebut maupun mekanisme resistensinya belum seluruhnya diketahui (Gupta *et al.*, 1995).

Cut C merupakan protein pengikat Cu pada sitoplasma yang berperan memindahkan kelebihan Cu dari sitoplasma. CutE merupakan protein membran dalam yang berperan mengikat Cu di dalam sel dan atau mentransfer Cu pada enzim yang membutuhkan. Mutasi gen cutE mengakibatkan kelebihan ion Cu bebas di dalam sel sehingga Cu berikatan dengan komponen seluler dan mengakibatkan toksisitas. CutF merupakan protein pengikat Cu pada membran luar yang berperan mengatur keluar-masuknya ion Cu. CutF bertanggung jawab mencegah sel terhadap toksisitas Cu dengan

cara mentranspor Cu keluar sel (Gupta *et al.*, 1995).

## PUSTAKA ACUAN

- Bender, C.L., and D.A. Cooksey. 1986. Indigenous Plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Conjugative Transfer and Role in Copper Resistance. *J. Bacteriol.* 165(2) : 534-541.
- Bender, C.L., and D.A. Cooksey. 1987. Molecular Cloning of Copper Resistance Genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 169(2) : 470-474.
- Brown, N.L., S.R. Barrett, J. Camakaris, B.T.O. Lee, and D.A. Rouch. 1995. Molecular Genetics and Transport Analysis of the Copper Resistance Determinant (pCo) from *Escherichia coli* Plasmid pRj1004. *Mol. Biol. Gen.* 17(6) : 1153 - 1166.
- Cha, J-S., and D.A. Cooksey. 1991. Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by Periplasmic and Outer Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(10): 8915 - 8919.
- Cha, J-S., and D.A. Cooksey. 1993. Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Component of the Copper Resistance Operon. *Appl. Environ. Microb.* 59(5) : 1671 - 1674.
- Cooksey, D.A., H.R. Azad, J-S. Cha, and C.K. Lim. 1990. Copper Resistance Gene Homologs in Pathogens and Saprophytic Bacterial Species from Tomato. *Appl. Environ. Microb.* 56(2) : 431 - 435.
- Cooksey, D.A. and H.R. Azad. 1992. Accumulation of Copper and Other Copper Resistant Plant Pathogenic and Saprophytic *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microb.* 58(1) : 274 - 278.
- Cooksey, D.A. 1994. Molecular Mechanisms of Copper Resistance and Accumulation in Bacteria. *FEMS Microb. Rev.* 14 : 381 - 386.
- Cooksey, D.A. 1996. Molecular Genetics and Evolution of Copper Resistance in Bacterial Plant Pathogens. *Mol. Gen. Evol. Pest. Resist* (series : ACS Symposium Series 645). P. 79 - 66.
- Gupta, S.D., B.T.O. Lee, J. Camakaris, and H.C. Wu. 1995. Identification of Cut C and Cut F (nlpE) Genes Involved in Cop